

POWERED BY **Dialog**

METHOD FOR IMMOBILIZING DNA FRAGMENT ON SURFACE OF SOLID PHASE CARRIER AND DNA CHIP

Publication Number: 2001-178442 (JP 2001178442 A) , July 03, 2001

Inventors:

- NISHIGAKI JUNJI
- SHINOKI HIROSHI

Applicants

- FUJI PHOTO FILM CO LTD

Application Number: 11-371329 (JP 99371329) , December 27, 1999

International Class:

- C12M-001/00
- C12M-001/34
- C12N-011/00
- C12N-015/09
- C12Q-001/68
- G01N-033/53
- G01N-033/566

Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To develop a method for immobilizing a DNA fragment on the surface of a solid phase carrier, by which the preliminarily prepared DNA fragment can be bound to the surface of the solid phase carrier by a rapid reaction and further by which the reaction product can stably maintain the bond, and to obtain a DNA chip not needing a blocking process.

SOLUTION: This method for immobilizing the DNA fragment on the surface of the solid phase carrier, characterized by bringing in a liquid phase the DNA fragment having a thiol group at the molecular terminal into contact with a solid phase carrier on whose surface the terminal of a chain molecule having a reactive substituent capable of reacting with the thiol group to form a covalent bond is immobilized, thereby forming the covalent bond between the DNA fragment and the chain molecule. A DNA chip obtained by the method, and a method for detecting a nucleic acid fragment having complementarity with the DNA fragment on the DNA chip by using the DNA chip.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

JAPIO

© 2005 Japan Patent Information Organization. All rights reserved.

Dialog® File Number 347 Accession Number 6950890

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-178442

(P2001-178442A)

(43)公開日 平成13年7月3日(2001.7.3)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト [*] (参考)
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 4
1/34		1/34	Z 4 B 0 2 9
C 1 2 N 11/00		C 1 2 N 11/00	4 B 0 3 3
15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	M

審査請求 未請求 請求項の数6 OL (全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平11-371329

(22)出願日 平成11年12月27日(1999.12.27)

(71)出願人 000005201

富士写真フイルム株式会社

神奈川県南足柄市中沼210番地

(72)発明者 西垣 純爾

神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真

フイルム株式会社内

(72)発明者 篠木 浩

埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フ

イルム株式会社内

(74)代理人 100074675

弁理士 柳川 泰男

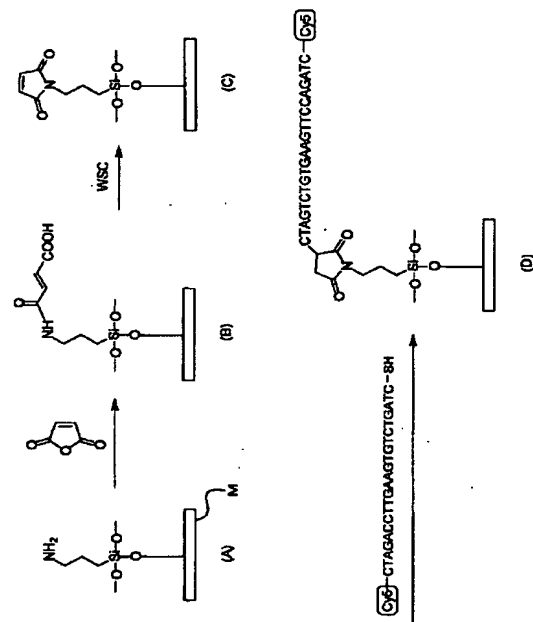
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 固相担体表面へのDNA断片の固定方法及びDNAチップ

(57)【要約】

【課題】 固相担体表面に、予め別に調製したDNA断片を迅速な反応によって結合させることが可能で、かつ、反応生成物が安定に結合を維持することが可能な固定方法を開発し、ブロッキング工程が不要なDNAチップを得ること。

【解決手段】 末端部にチオール基を有するDNA断片と、該チオール基と反応して共有結合を形成し得る反応性置換基を有する鎖状分子が一方の末端で表面に固定された固相担体とを液相にて接触させることにより、該DNA断片と鎖状分子との間で共有結合を形成させることを特徴とするDNA断片の固相担体表面への固定方法、この方法により得られたDNAチップ、そしてそのDNAチップを用いるDNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片を検出する方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 末端部にチオール基を有するDNA断片と、該チオール基と反応して共有結合を形成し得る反応性置換基を有する鎖状分子が一方の末端で表面に固定された固相担体とを液相にて接触させることにより、該DNA断片と鎖状分子との間で共有結合を形成させることを特徴とするDNA断片の固相担体表面への固定方法。

【請求項2】 チオール基と反応して共有結合を形成し得る反応性置換基が、マレイミジル基、 α 、 β -不飽和カルボニル基、 α -ハロカルボニル基、ハロゲン化アルキル基、アジリジン基、およびジスルフィド基からなる群より選ばれる基を含む置換基であることを特徴とする請求項1に記載のDNA断片の固相担体表面への固定方法。

【請求項3】 固相担体の表面に固定された反応性置換基を有する鎖状分子が、アミノ基を有するシランカップリング剤を固相担体表面に接触させることにより固相担体表面に導入したアミノ基に、カルボン酸活性化剤を反応させて形成されたものであることを特徴とする請求項1に記載のDNA断片の固相担体表面への固定方法。

【請求項4】 請求項1乃至3のうちのいずれかに記載の方法によって得られたDNAチップ。

【請求項5】 請求項4に記載のDNAチップの表面に、蛍光物質もしくは放射性物質で標識した核酸断片試料を含む水性液を付与する工程、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する核酸断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定する工程、そしてDNAチップ上に固定された標識核酸断片試料の蛍光標識もしくは放射性標識を検出する工程からなる、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法。

【請求項6】 請求項4に記載のDNAチップの表面に、蛍光発生基もしくは導電性基を有するインターカレータと核酸断片試料を含む水性液を付与する工程、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する核酸断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定する工程、そしてDNAチップのDNA断片と核酸断片試料とから形成されたハイブリッド構造内に取り込まれたインターカレータの蛍光発生基から発する蛍光、もしくは導電性基を介して流れる電流を検出する工程からなる、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、遺伝子の発現、変異、多型等の同時解析に非常に有用である、多数のDNA断片やオリゴヌクレオチドを固相表面に整列させた高密度アレイ（DNAチップ）の作製に必要な、DNA断片の固相担体表面への固定方法に関する。本発明はまた、そのDNA断片の固相担体表面への固定方法により

製造されたDNAチップ、そしてDNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法にも関する。

【0002】

【従来の技術】 多彩な生物の全遺伝子機能を効率的に解析するための技術開発が進んでおり、その解析手段として、DNAチップが利用されている。DNAチップは通常、スライドガラス等の固相担体に多数のDNA断片を整列固定させたマイクロアレイの形態にあり、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を持つDNA断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定し、検出する方法に利用される。形成されたハイブリッドの検出手段としては、DNA断片試料に予め結合させた蛍光標識あるいは放射性標識を利用する方法、そしてハイブリッドに取り込まれる導電性基を持つインターカレータを利用する方法などが知られている。

【0003】 DNAチップを用いるDNAチップ技術は、DNA以外の生体分子にも適用可能であり、創薬研究、疾病の診断や予防法の開発、エネルギーや環境問題対策等の研究開発に新しい手段を提供するものとして期待されている。

【0004】 DNAの解析手段としてのDNAチップの利用が具体化してきたのは、DNAの塩基配列をオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって決定する方法（SBH, sequencing by hybridization）が考案されたことに始まる（Drmanac, R. et al., Genomics, 4, page 114 (1989)）。SBHは、ゲル電気泳動を用いる塩基配列決定法の限界を克服できる方法ではあったが、実用化には至らなかった。

【0005】 その後、DNAチップ作製技術が開発され、遺伝子の発現、変異、多型等を短時間で効率よく調べる、いわゆるHTS (high throughput screening) が可能となった（Fodor, S. P. A., Science, 251, page 767 (1991) およびSchena, M., Science, 270, page 467 (1995)）。

【0006】 しかし、DNAチップ利用技術を実用化するためには、多数のDNA断片やオリゴヌクレオチドを固相担体表面に整列固定させるためのDNAチップの作製技術が必要とされる。

【0007】 DNAチップの作製方法としては、固相担体表面で直接DNA断片を合成する方法（「オン・チップ法」という。）と、予め別に調製したDNA断片を固相担体表面に固定する方法とが知られている。オン・チップ法としては、光照射で選択的に除去される保護基の使用と、半導体製造に利用されるフォトリソグラフィ技術および固相合成技術とを組み合わせ、微小なマトリックスの所定の領域での選択的合成を行う方法（「マ

スキング技術」という。)が代表的である。

【0008】予め調製したDNA断片を固相担体表面に固定する方法としては、DNA断片の種類や固相担体の種類に応じて下記の方法がある。

(1) 固定するDNA断片がcDNA (mRNAを鋳型にして合成した相補的DNA) やPCR産物 (cDNAをPCR法によって増幅させたDNA断片) の場合には、これらをDNAチップ作製装置に備えられたスポット装置を用いて、ポリ陽イオン (ポリリシン、ポリエチレンイミン等) で表面処理した固相担体表面に点着して、DNAの荷電を利用して固相担体に静電結合させる方法が一般的に利用される。また、固相担体表面の処理方法として、アミノ基、アルデヒド基、エポキシ基等を有するシランカップリング剤を用いる方法も利用されている (Geo, Z. et al., *Nucleic Acid Research*, 22, 5456-5465 (1994))。この場合には、アミノ基、アルデヒド基等は、共有結合により固相担体表面に導入されるため、ポリ陽イオンによる場合と比較して安定に固相担体表面に存在する。

【0009】DNAの荷電を利用する方法の変法として、アミノ基で修飾したPCR産物をSSC (標準塩塩クエン酸緩衝液) に懸濁させ、これをシリル化したスライドガラス表面に点着し、インキュベートした後、水素化ホウ素ナトリウムによる処理および加熱処理を順に行う方法が報告されている (Scheda, M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10614-10619 (1996))。しかし、この固定方法では必ずしも十分な安定度が得られ難いという問題がある。DNAチップ技術では、検出限界が重要となる。そのため、固相担体表面に十分な量で安定にDNA断片を固定する技術の開発は、固定DNA断片と標識した試料核酸断片とのハイブリダイゼーションの検出限界の向上に大きく寄与する。

【0010】(2) 固定するDNA断片が合成オリゴヌクレオチドの場合には、反応活性基を導入したオリゴヌクレオチドを合成し、表面処理した固相担体表面に該オリゴヌクレオチドを点着し、共有結合させる (『蛋白質・核酸・酵素』、43巻、(1998)、2004-2011、Lamture, J. B. et al., *Nucl. Acids Res.*, 22, 2121-2125, 1994、およびGuo, Z., et al., *Nucl. Acids Res.*, 22, 5456-5465, 1994)。例えば、アミノ基を導入したスライドガラスに、PDC (p-フェニレンジイソチオシアネート) 存在下、アミノ基導入オリゴヌクレオチドを反応させる方法、および該スライドガラスに、アルデヒド基導入オリゴヌクレオチドを反応させる方法が知られている。これらの二つの方法は、前記(1)のDNAの荷電を利用する方法と比べて、オリゴヌクレオチドが固相

担体表面に安定に固定される。しかし、PDCを存在させる方法は、PDCとアミノ基導入オリゴヌクレオチドとの反応が遅く、またアルデヒド基導入オリゴヌクレオチドを用いる方法は、反応生成物であるシッフ塩基の安定性が低い (通常、加水分解が起こり易い) という問題点を有し、さらに、固相表面にアミノ基のようにDNAとの相互作用の強い官能基が全面に存在すると、被検体である核酸断片がDNAチップ全面に非特異的に付着しやすいため、検出を妨害するという問題がある。このため、これを防止するために、未反応の官能基を塞ぐ、ブロッキングという工程が必要であった。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、固相担体表面に、予め別に調製したDNA断片を迅速な反応によって結合させることが可能で、かつ、反応生成物が安定に結合を維持することが可能な固定方法、ブロッキング工程を特に必要としないDNAチップ、および核酸断片の検出方法を提供することを、その課題とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】上記の課題は下記の本発明によって解決された。

【0013】(1) 末端部にチオール基を有するDNA断片と、該チオール基と反応して共有結合を形成し得る反応性置換基を有する鎖状分子が一方の末端で表面に固定された固相担体とを液相にて接触させることにより、該DNA断片と鎖状分子との間で共有結合を形成させることを特徴とするDNA断片の固相担体表面への固定方法。この固定方法において、チオール基と反応して共有結合を形成し得る反応性置換基は、マレイミジル基、 α 、 β -不飽和カルボニル基、 α -ハロカルボニル基、ハロゲン化アルキル基、アジリジン基、およびジスルフィド基からなる群より選ばれる基を含む置換基であることが好ましい。また、固相担体の表面に固定された反応性置換基を有する鎖状分子が、アミノ基を有するシランカップリング剤を固相担体表面に接触させることにより固相担体表面に導入したアミノ基に、カルボン酸活性化剤を反応させて形成されたものであることが好ましい。

(2) 上記の方法によって得られたDNAチップ。

【0014】(3) 上記のDNAチップの表面に、蛍光物質もしくは放射性物質で標識した核酸断片試料を含む水性液を付与する工程、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する核酸断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定する工程、そしてDNAチップ上に固定された標識核酸断片試料の蛍光標識もしくは放射性標識を検出する工程からなる、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法。

(4) 上記のDNAチップの表面に、導電性基を有するインターカレータと核酸断片試料とを含む水性液を付与

する工程、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する核酸断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定する工程、そしてDNAチップのDNA断片と核酸断片試料とから形成されたハイブリッド構造内に取り込まれたインターカレータの導電性基を介して流れる電流を電気化学的に検出する工程からなる、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法。

【0015】本発明のDNA断片の固相担体表面への固定方法の好ましい態様は、以下の通りである。

(1) 自由末端にチオール反応性基を有する鎖状分子を、固相担体表面に、アミノ基を有するシランカップリング剤を接触させることによって導入したアミノ基と無水マレイン酸とを反応させて製造する。

(2) DNA断片として、その塩基配列が既知であるものを用いる。

【0016】

【発明の実施の形態】本発明のDNA断片固定固相担体(以下「DNAチップ」という。)では、固相担体表面に一方の末端で固定された鎖状分子に、チオール反応性基とチオール基により形成される共有結合を介してDNA断片が固定されている。DNA断片の固相担体表面への固定は、固相担体表面に、自由末端にチオール反応性基を有する鎖状分子を他方の側の末端にて結合された連結基を形成する工程、そして、該連結基のチオール反応性基と、一方の末端にチオール基を有するDNA断片の該チオール基とを反応させることにより、共有結合を形成させる工程を順次行うことによって行なうことが好ましい。

【0017】本発明の固相担体への核酸断片の代表的な固定方法を、添付図面の図1に模式的に示す。図1において、鎖状分子(LA)は、自由末端のチオール反応性基Aと、固相担体(M)表面と自由末端チオール反応性基とを結ぶ連結基(L)とからなる。鎖状分子を有する固相担体(1)は、表面にアミノ基を有する固相担体

(4)の該アミノ基に、カルボン酸活性化試薬(X1)を反応させることによって得ることができる。チオール反応性基Aがマレイミジル基である場合は、固相担体

(4)の該アミノ基に無水マレイン酸を反応させることによって(1)を得ることができる。鎖状分子を有する固相担体(1)の自由末端チオール反応性基を有する固相担体と、一方の末端にチオール基を有するDNA断片

(2)とを反応させることによって、DNAチップ

(3)を得ることができる。ここで、Yは、クロスリンカーを表す。A¹は、固相担体表面へのアミノ基導入の方法によって決定される。mは、0または1を表す。連結上(L)は、A¹およびカルボン酸基導入試薬(X¹)によって決定される。ーリン酸エステル基ーNNNN・・・NNは、DNA断片を表す。以下、図1の各工程について説明する。

【0018】本発明で用いる固相担体は、疎水性、あるいは親水性の低い担体であることが好ましい。また、その表面が凹凸を有する平面性の低いものであっても好ましく用いることができる。固相担体の材質としては、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックスもしくはニューセラミックス、ポリエチレンテレフタレート、酢酸セルロース、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等のポリマー、シリコン、活性炭、多孔質ガラス、多孔質セラミックス、多孔質シリコン、多孔質活性炭、織物、編み物、不織布、濾紙、短繊維、メンブレンフィルター等の多孔質物質、金などの導電性材料などを挙げることができる。多孔質物質の細孔の大きさは、2乃至1000nmの範囲にあることが好ましく、2乃至500nmの範囲にあることが特に好ましい。固相担体の材質は、ガラスもしくはシリコンであることが特に好ましい。これは、表面処理の容易さや電気化学的方法による解析の容易さによるものである。固相担体の厚さは、100乃至2000μmの範囲にあることが好ましい。

【0019】固相担体は、DNA断片を固定させるため、その表面がポリ陽イオン(例えば、ポリーレーリシン、ポリエチレンイミン、ポリアルキルアミン等であることが好ましく、ポリーレーリシンであることがさらに好ましい)で被覆処理、あるいは固相担体表面への導入置換基を有するシランカップリング剤によって接触処理されていることが好ましく、固相担体表面への導入置換基を有するシランカップリング剤によって接触処理されていることが特に好ましい。固相担体表面への導入置換基としては、アミノ基であることが好ましい。ポリ陽イオンによる場合には、アミノ基が静電結合によって固相担体表面に導入されるのに対して、シランカップリング剤による場合には、共有結合によって導入されるため、アミノ基が固相担体表面に安定に存在する。アミノ基の他に、アルデヒド基、エポキシ基、カルボキシ基、水酸基あるいはチオール基も好ましく導入することができる。シランカップリング剤の例としては、γ-アミノプロピルトリエトキシシラン、N-β-(アミノエチル)γ-アミノプロピルトリメトキシシラン、あるいはN-β-(アミノエチル)-γ-アミノプロピルメチルジメトキシシランを用いることが好ましく、γ-アミノプロピルトリエトキシシランを用いることが特に好ましい。

【0020】ポリ陽イオンを用いる処理に、シランカップリング剤による処理を組み合わせる行なってもよい。疎水性、あるいは親水性の低い固相担体とDNA断片との静電的相互作用を促進することができる。表面処理がされた固相担体表面上に、さらに、電荷を有する親水性高分子等からなる層や架橋剤からなる層を設けてもよい。このような溝を設けることによって表面処理がされた固相担体の凹凸を軽減することができる。固相担体の種類によっては、その担体中に親水性高分子等を含有さ

せることも可能であり、このような処理を施した固相担体も好ましく用いることができる。

【0021】Zは、該アミノ基の導入の方法によって決定されるもので、ポリ陽イオンを用いて導入した場合には、単結合（但し、静電的な結合）、該シランカップリング剤によって導入した場合には、シランカップリング剤によって決定される。

【0022】チオール反応性基は、公知の合成反応によって導入することができる。チオール反応性基はMolecular probes社刊、Handbook of fluorescent Probes, 6th edition, 4950頁に記載のものを使用することができるが、以下にその詳細を記す。チオール反応性基の選択は反応性基とチオール基により形成される共有結合の安定性を第一に考慮する必要がある。安定な結合を与える反応性基塩基としては、 α 、 β -不飽和カルボニル基とチオール基の1, 4-付加生成物、 α -ハロカルボニル基とチオール基による求核置換生成物、ハロゲン化アルキル基とチオール基による求核置換生成物、アジリジンとチオール基によるアジリジン開環生成物、ジスルフィド基とチオール基によるジスルフィド交換反応生成物等が挙げられる。 α 、 β -不飽和カルボニル基を含む官能基は、例えば、マレイミド、2-シクロヘキセノン、2-シクロペンタノン、ウラシル等が挙げられるが、マレイミド、ウラシルが好ましく、マレイミドが最も好ましい。 α -ハロカルボニルとしては、ヨードメチルカルボニル、ブロモメチルカルボニルが挙げられるがヨードメチルカルボニル基が最も好ましい。

【0023】ハロゲン化アルキル基としては、クロロアルキル、ブロモアルキル、ヨードアルキルが挙げられ、好ましくはブロモアルキル、ヨードアルキルであり、ヨードアルキルが最も好ましい。ジスルフィド基は、一方の硫黄原子にアルキル基が結合し、他方の硫黄原子にヘテロ環基（例えば2-ピリジル、4-ピリジル）が結合している場合が好ましく、最も好ましくは一方の硫黄原子に2-ピリジル基が結合した場合である。

【0024】チオール反応性基とチオール基の反応は、通常pH6乃至9の範囲で、室温乃至それ以下の温度範囲にて行うことができる。

【0025】クロスリンカー（Y）は、単結合、アルキレン基あるいはN-アルキルアミノアルキレン基であることが好ましく、単結合、ヘキシレン基あるいはN-メチルアミノヘキシレン基であることが特に好ましい。

【0026】DNA断片は、目的によって二通りに分けることができる。遺伝子の発現を調べるためには、cDNA、cDNAの一部、EST等のポリヌクレオチドを使用することが好ましい。これらのポリヌクレオチドは、その機能が未知であってもよいが、一般的にはデータベースに登録された配列を基にしてcDNAのライブラリー、ゲノムのライブラリーあるいは全ゲノムをテンプレートとしてPCR法によって増幅して調製する（以

下、「PCR産物」という。）。PCR法によって増幅しないものも好ましく使用することができる。また、遺伝子の変異や多型を調べるには、標準となる既知の配列をもとにして、変異や多型に対応する種々のオリゴヌクレオチドを合成し、これを使用することが好ましい。さらに、塩基配列分析の場合には、 4^n （ n は、塩基の長さ）種のオリゴヌクレオチドを合成したものを使用することが好ましい。DNA断片の塩基配列は、一般的な塩基配列決定法によって予めその配列が決定されていることが好ましい。DNA断片は、2乃至50量体であることが好ましく、10乃至25量体であることが特に好ましい。

【0027】DNA断片には、固相担体表面の導入置換基と結合を形成するための反応活性基を一方の末端に導入する。反応活性基は、チオール基である。

【0028】DNA断片の点着は、DNA断片を水性媒体に溶解あるいは分散した水性液を、96穴もしくは384穴プラスチックプレートに分注し、分注した水性液をスポッター装置等を用いて固相担体表面上に滴下して行うことが好ましい。

【0029】点着後のDNA断片の乾燥を防ぐために、DNA断片が溶解あるいは分散してなる水性液中に、高沸点の物質を添加してもよい。高沸点の物質としては、DNA断片が溶解あるいは分散してなる水性液に溶解し得るものであって、試料核酸断片とのハイブリダイゼーションを妨げることがなく、かつ粘性の大きくない物質であることが好ましい。このような物質としては、グリセリン、エチレングリコール、ジメチルスルホキシドおよび低分子の親水性ポリマーを挙げることができる。親水性ポリマーとしては、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール、ポリアクリル酸ナトリウム等を挙げることができる。ポリマーの分子量は 10_3 乃至 10^6 の範囲にあることが好ましい。高沸点の物質としては、グリセリンあるいはエチレングリコールを用いることがさらに好ましく、グリセリンを用いることが特に好ましい。高沸点の物質の濃度は、DNA断片の水性液中、0.1乃至2容量%の範囲にあることが好ましく、0.5乃至1容量%の範囲にあることが特に好ましい。

【0030】また、同じ目的のために、DNA断片を点着した後の固相担体を、90%以上の湿度および25乃至50℃の温度範囲の環境に置くことも好ましい。

【0031】DNA断片を点着後、インキュベーションを行うことも好ましい。インキュベート後、未点着のDNA断片を洗浄して除去することが好ましい。

【0032】DNA断片は、固相担体表面に対して、 10^2 乃至 10^5 種類/ cm^2 の範囲にあることが好ましい。DNA断片の量は、1乃至 10^{15} モルの範囲にあり、重量としては数ng以下であることが好ましい。点着によって、DNA断片の水性液は、固相担体表面にドットの形状で固定される。ドットの形状は、ほとんど円

形である。形状に変動がないことは、遺伝子発現の定量的解析や一塩基変異を解析するために重要である。ドット間の距離は、0乃至1.5 mmの範囲にあることが好ましく、100乃至300 μm の範囲にあることが特に好ましい。1つのドットの大きさは、直径が50乃至300 μm の範囲にあることが好ましい。点着する量は、100 pL乃至1 μL の範囲にあることが好ましく、1乃至100 nLの範囲にあることが特に好ましい。

【0033】図1の固相担体(1)の表面にメルカプト基を有するDNA断片(2)を点着させると、反応性基Aとメルカプト基との反応が進行するが、固相担体

(1)の表面には該DNA断片(2)が結合していない未反応のAも存在する。このようなAは、標識された核酸断片試料との非特異的な反応を生じる可能性があるため、予め、該Aをブロッキング処理しておくことが好ましい。ブロッキング処理に使用されるブロッキング試料としては、固相担体(1)の表面に、チオグリコール酸、3-メルカプトプロピオン酸、チオサリチル酸あるいはこれらの塩を挙げることができる。

【0034】上記の工程によって作製されたDNAチップの寿命は、cDNAが固定されてなるcDNAチップで数週間、オリゴDNAが固定されてなるオリゴDNAチップではさらに長期間である。これらのDNAチップは、遺伝子発現のモニタリング、塩基配列の決定、変異解析、多型解析等に利用される。検出原理は、後述する標識した試料核酸断片とのハイブリダーゼーションである。

【0035】標識方法としては、RI法と非RI法(蛍光法、ビオチン法、電気化学的方法、化学発光法等)とが知られているが、本発明では蛍光法を用いる。蛍光物質としては、核酸の塩基部分と結合できるものであれば何れも用いることができるが、シアニン色素(例えば、CyDyeTMシリーズのCy3、Cy5等)、ローダミン6G試薬、N-アセトキシ-N²-アセチルアミノフルオレン(AAF)あるいはAAIF(AAFのヨウ素誘導体)を使用することができる。また、無標識の核酸試料を用いたハイブリッドDNAの検出には、エチジウムブロミド、SYBRTM Green I、SYBRTM Green II、HOECHST 33258、HOECHST 33342、YO-PRO-1 Iodide、YO-PRO-3 Iodide等を使用することができる。

【0036】なお、上記の標識を利用する以外にも、導電性基を持ち、形成されたハイブリッド構造体に取り込まれる性質を持つインターカレータを用いる電気化学的な検出方法を利用する方法も知られており、本発明のDNAチップは電気化学的な検出方法に利用することもできる。あるいは、蛍光発生基を持ち、形成されたハイブリッド構造体に取り込まれる性質を持つインターカレータを用いて、ハイブリッドの形成を蛍光法により検出方

法を利用する方法も知られており、本発明のDNAチップはこの検出方法に利用することもできる。

【0037】試料核酸断片としては、その配列や機能が未知であるDNA断片試料あるいはRNA断片試料を用いることが好ましい。試料核酸断片は、遺伝子発現を調べる目的では、真核生物の細胞や組織サンプルから単離することが好ましい。試料がゲノムならば、赤血球を除く任意の組織サンプルから単離することが好ましい。赤血球を除く任意の組織は、末梢血液リンパ球、皮膚、毛髪、精液等であることが好ましい。試料がmRNAならば、mRNAが発現される組織サンプルから抽出することが好ましい。mRNAは、逆転写反応により標識dNTP(「dNTP」は、塩基がアデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)もしくはチミン(T)であるデオキシリボヌクレオチドを意味する。)を取り込ませて標識cDNAとすることが好ましい。dNTPとしては、化学的な安定性のため、dCTPを用いることが好ましい。1回のハイブリダイゼーションに必要なmRNA量は、液量や標識方法によって異なるが、数 μg 以下であることが好ましい。尚、DNAチップ上のDNA断片がオリゴDNAである場合には、試料核酸断片は低分子化しておくことが望ましい。原核生物の細胞では、mRNAの選択的な抽出が困難なため、全RNAを標識することが好ましい。試料核酸断片は、遺伝子の変異や多型を調べる目的では、標識プライマーもしくは標識dNTPを含む反応系で標的領域のPCRを行って得ることが好ましい。

【0038】ハイブリダイゼーションは、96穴もしくは384穴プラスチックプレートに分注しておいた、標識した試料核酸断片が溶解あるいは分散してなる水性液を、上記で作製したDNAチップ上に点着することによって実施することが好ましい。点着の量は、1乃至100 nLの範囲にあることが好ましい。ハイブリダイゼーションは、室温乃至70℃の温度範囲で、そして6乃至20時間の範囲で実施することが好ましい。ハイブリダイゼーション終了後、界面活性剤と緩衝液との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の試料核酸断片を除去することが好ましい。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を用いることが好ましい。緩衝液としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等を用いることができるが、クエン酸緩衝液を用いることが特に好ましい。

【0039】DNAチップを用いるハイブリダイゼーションの特徴は、標識した試料核酸断片の使用量が非常に少ないことである。そのため、固相担体に固定するDNA断片の鎖長や標識した試料核酸断片の種類により、ハイブリダーゼーションの最適条件を設定する必要がある。遺伝子発現の解析には、低発現の遺伝子も十分に検出できるように、長時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。一塩基変異の検出には、短時間のハ

ハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。また、互いに異なる蛍光物質によって標識した試料核酸断片を二種類用意し、これらを同時にハイブリダイゼーションに用いることにより、同一のDNAチップ上で発現量の比較や定量ができる特徴もある。

【0040】

【実施例】〔実施例1〕DNA断片固定スライドの作成及びDNA断片の固定量の測定

本発明の固定方法を、DNA断片の反応経路によって表すこととし、その反応経路を図2に示す。図中、1は、スライドガラスを表す。

【0041】（1）マレイミジル基が導入されたスライド（C）の作成

2重量%アミノプロピルエトキシシラン（信越化学工業（株）製）のエタノール溶液に、スライドガラス（25mm×75mm）を10分間浸した後取り出し、エタノールで洗浄後、110℃で10分間乾燥して、シラン化合物被覆スライド（A）を作成した。次いで、このシラン化合物被覆スライド（A）を、無水マレイン酸（2.5g）の1-メチル-2-ピロリドン（50mL）溶液に1時間浸した後取り出し、アセトニトリルで洗浄し、1時間減圧下乾燥した。乾燥後の、末端にカルボン酸基が導入されたスライド（B）を、WSC（水溶性カルボジミド）（955mg）のアセトニトリル（50mL）溶液に2時間浸し、アセトニトリルで洗浄し、1時間減圧下に乾燥し、マレイミジル基が導入されたスライド（C）を得た。

【0042】（2）DNA断片の点着と蛍光強度の測定
3'末端および5'末端がそれぞれチオール基、蛍光標識試薬（FluoroLink Cy5 dCTP、アマシヤム・ファルマシア・バイオテック社製）で修飾されたDNA断片（3'CTAGTCTGTGAAGTGTCTGATC5'）を0.1M炭酸緩衝液（pH9.3）に分散してなる水性液（ 1×10^{-6} M、1 μ L）を、上記（1）で得たスライド（C）に点着した。直ちに、点着後のスライドを25℃、湿度90%にて1時間放置した後、このスライドを0.1重量%SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）と2×SSC（2×SSC：SSCの原液を2倍に希釈した溶液、SSC：標準食塩クエン酸緩衝液）との混合溶液で2回、0.2×SSC水溶液で1回順次洗浄した。次いで、上記の洗浄後のスライドを0.1Mチオサリチル酸水溶液（pH10）中に1時間30分浸漬した後、蒸留水で洗浄し、室温で乾燥させ、DNA断片が固定されたスライド（D1）を得た。このスライド（D1）表面の蛍光強度を蛍光スキャニング装置で測定したところ、1680であった。本発明の固定化方法により、DNA断片が効率よくスライドガラスに固定されたことが分か

る。

【0043】〔実施例2〕試料DNA断片の検出

（1）DNAチップの作成

3'末端が蛍光標識試薬で修飾されていないDNA断片を用いる以外は実施例1と同様にして、DNA断片が固定されたスライド（D2）を得た。

【0044】（2）試料DNA断片の検出

5'末端にCy5が結合した22merの試料オリゴヌクレオチド（GATCAGACACTTCACAGACTAG5'）をハイブリダイゼーション用溶液（4×SSCおよび10重量%のSDSの混合溶液）（20 μ L）に分散させたものを、上記（1）で得たスライド（D2）に点着し、表面を顕微鏡用カバーガラスで保護した後、モイスチャンバー内にて60℃で20時間インキュベートした。次いで、このものを0.1重量%SDSと2×SSCとの混合溶液、0.1重量%SDSと0.2×SSCとの混合溶液、および0.2×SSC水溶液で順次洗浄した後、600rpmで20秒間遠心し、室温で乾燥した。スライドガラス表面の蛍光強度を蛍光スキャニング装置で測定したところ、632であった。

【0045】本発明の固定化方法によって作成されたDNAチップを用いることによって、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する試料DNA断片を検出できることが分かる。

【0046】

【発明の効果】本発明によって、固相担体表面にDNA断片を安定かつ迅速に固定することができる。特に、固相担体表面にアミノ酸をシランカップリング剤を用いて導入した場合には、アミノ基の固相担体表面への結合も、DNA断片の結合も共に共有結合であるため、強固にDNA断片を固定することができる。DNA断片の安定な固定は、遺伝子解析等に有効に利用することができる高い検出限界を有するDNAチップの作製を可能にする。その一つの例として、本発明によって作製されたDNAチップを用いて、試料核酸断片とのハイブリダイゼーションを行うことにより、DNAチップに固定されているDNA断片に相補性を有する試料核酸断片を感度よく検出することができる。

【図面の簡単な説明】

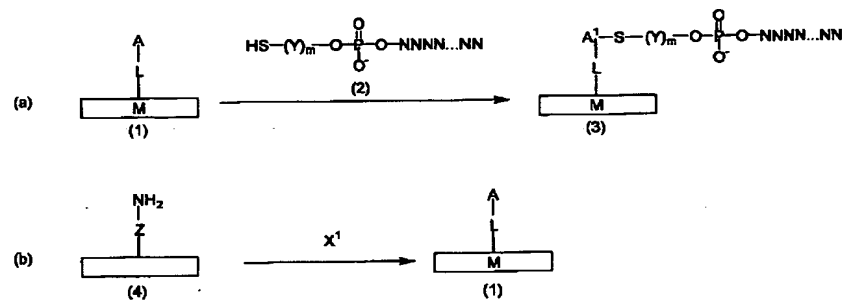
【図1】本発明の代表的な固定方法を示す模式図である。

【図2】本発明のDNA断片の固定方法（シランカップリング剤を用いる固相担体表面へのアミノ基の導入する工程を含む）を示す模式図である。

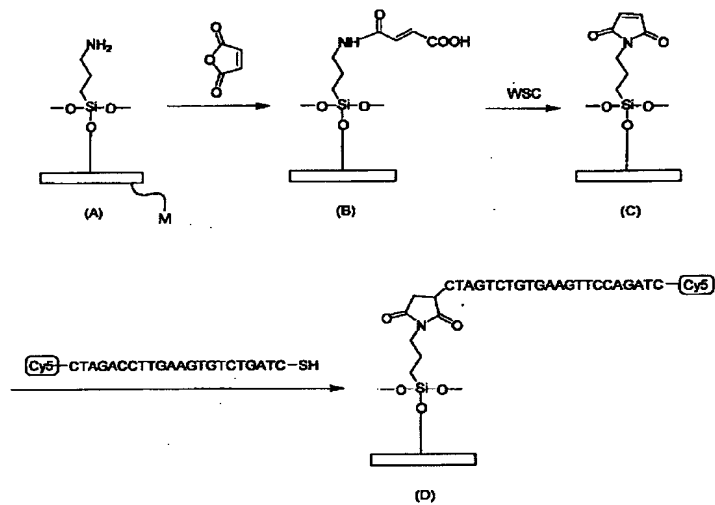
【符号の説明】

M スライドガラス

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷

G 0 1 N 33/53
33/566

識別記号

Z N A

F I

G 0 1 N 33/566
C 1 2 N 15/00

テーマコード (参考)

Z N A
Z N A A

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA04 CA06 CA09
CA11 HA11 HA13 HA19
4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA01
FA15
4B033 NA01 NA45 NB04 NB25 NB32
NB61 NC03 NC12 ND05 ND11
NF10
4B063 QA01 QA08 QA12 QA13 QQ03
QQ07 QQ08 QQ42 QQ52 QQ53
QR32 QR41 QR56 QR66 QR84
QS03 QS24 QS34 QS36 QX02
QX04 QX07